

培養細胞を用いた皮膚刺激性評価

加納 聰 杉林 堅次

培養細胞を用いた皮膚刺激性評価

加納 聡*¹ 杉林 堅次*²

Abstract : Skin irritation is one of the most common cutaneous adverse effects, and evaluation of its potential and extent is indispensable in development of topical drug formulations and cosmetics. Recently, the criticism to animal experiments has increased from a viewpoint of the animal welfare and protection. Especially, reduction in the animal experiments must be achieved worldwide in the cosmetics field. The marketing of cosmetics that developed by the animal experiment are prohibited by the 7th amendment of EU Cosmetic Directive in the EU from March, 2009. Therefore, the alternative methods to animal experiments using cultured tissues have been paid attention to evaluate cosmetics and cosmetic ingredients. Currently the *in vitro* skin irritation tests using a three-dimensional cultured human skin model have been validated by ECVAM as an alternative to animal experiments. It is also useful to estimate skin irritation using a simple cultured cell from mechanism of skin irritation. Moreover, developing the *in vitro* method will be connected to improved prediction of *in vivo* study, to reduction of animal research, and finally to proper use of pharmaceutical products.

Key words : skin irritation, cultured cell, three-dimensional cultured human skin mode, MTT, cytotoxicity

1. はじめに

皮膚刺激性は、皮膚における最も一般的な副作用の一つである。また、皮膚刺激性の評価は、皮膚に適用する医薬品や化粧品などを開発する上で不可欠である。皮膚刺激性は、外来の化学物質や物理的因子などによるダメージによって生じる可逆的な炎症反応として定義され、紅斑や浮腫などの皮膚反応を引き起こす。従来から化学物質の皮膚に対する刺激性は、ヒトのパッチテストによ

て評価されるが、その前段階ではウサギやモルモットなどの動物を用いたDraize試験¹⁾がその主役をなしている。

一方、近年動物愛護の観点から、動物実験に対する批判が高まり、特に化粧品分野においては世界的に動物実験を減らす流れにあり、EU化粧品指令第7次改正²⁾によって、欧州連合(EU)内では2009年3月から動物実験を用いて開発した化粧品の販売が禁止される。そのため、培養組織や細胞を用いた代替試験法に対する期待が世界的

“Evaluation of skin irritation using cultured cells.”



*¹ Satoshi Kano (Maruho Co., Ltd., Kyoto R&D Center, マルホ株式会社京都R&Dセンター 研究部薬物動態研究グループ—600-8815 京都府京都市下京区中堂寺栗田町93)

*² Kenji Sugibayashi (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座—350-0295 埼玉県坂戸市けやき台1-1)

*¹ (写真左) 1993年福山大学薬学部薬学研究科修士課程修了、同年マルホ株式会社入社、現在、研究部薬物動態研究グループ主任研究員。

*² (写真右) 1985年城西大学薬学部講師、89年同助教授、98年同教授、現在、城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座教授、同生命科学研究センター所長、薬科学科主任、日本化粧品科学会理事、日本実験動物代替法学会評議員、他。

に高まっている。

動物実験代替法に関して、毒性試験ガイドラインでは、遺伝毒性試験におけるAmes試験や染色体異常試験が*in vitro*毒性試験として有名であり、Balb/c 3T3細胞を用いた光毒性試験は、OECDガイドラインに採用されている³⁾。また、酵母光育成阻害試験と赤血球光溶血試験のバッテリー試験についてもその有用性が認められている⁴⁾。

皮膚刺激性試験に関しては、培養皮膚を用いた*in vitro*皮膚刺激性試験が動物実験代替法として注目されている。培養皮膚は、1970年代にGreenやBellなどの先達によって*in vitro*培養法が確立され、その技術を応用した製品が既に市販されている。この培養皮膚は、Caco-2などの上皮細胞単層膜とは異なり、三次元型の培養細胞膜である。構造的には、TESTSKIN™ (TOYOBO Co., Ltd.) やVitrolife-Skin™ (Gunze Co., Ltd.) のように線維芽細胞を包埋したコラーゲンゲルやスポンジからなる真皮層および多層に分化した角化細胞からなる表皮層の2層を有する皮膚モデルとEpiDerm™ (Kurabo Co., Ltd.) やLabCyte™ (Japan Tissue Engineering Co., Ltd) のように表皮層のみからなる表皮モデルに大別される。

2. 三次元培養皮膚（表皮）モデルを用いた*in vitro*皮膚刺激性試験

三次元培養皮膚（表皮）モデルは、実際の皮膚の構造に極めて近いものの血管系が存在しないため、動物を用いたDraize試験のように紅斑や浮腫を起こさないといった問題点がある。そのため、評価にはもっぱら細胞毒性試験が用いられ、1) MTT試験、2) ニュートラルレッドの取り込み、3) 乳酸脱水素酵素の放出、その他4) サイトカインの放出等が指標として利用されている。これらの内、細胞毒性試験として汎用されているMTT試験は、細胞内ミトコンドリアのコハク酸脱水素酵素によってMTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) が還元されて生じるformazanの割合を生細胞率（または、死細胞率）とする方法であり、三次元培養皮膚（表皮）モデルを用いた*in vitro*皮膚刺激性試験については、ECVAM (European Center for the

Validation of Alternative Methods) を中心に試験条件やバリデーションの検討が実施されている^{5)~11)}。また、本邦においても利用可能な皮膚（表皮）モデルを用いたバリデーション試験が実施されている^{12) 13)}。

3. 日本で市販されている培養皮膚（表皮）モデル

皮膚モデル

TESTSKIN™ (TOYOBO Co., Ltd.)

Vitrolife-Skin™ (Gunze Co., Ltd.)

表皮モデル

EpiDerm™ (Kurabo Co., Ltd.)

LabCyte™ (Japan Tissue Engineering Co., Ltd.)

三次元培養皮膚（表皮）モデルの多くは、セルカルチャーインサート（培養カップ）を用いてポリカーボネートなどのメンブランフィルター上で培養されたキットとして販売されており、培養皮膚（表皮）モデルの専用培地が用意されている。

4. 三次元培養皮膚（表皮）モデルを用いた皮膚刺激性試験法

三次元培養皮膚を用いた皮膚刺激性試験の一般的な方法を以下に示す。

- ①プレートの各wellに培地を加え、モデル（セルカルチャーインサート）をセットする。
- ②37℃、5% CO₂の条件で1時間プレインキュベートする。
- ③被験物質を適用し、37℃、5% CO₂の条件で所定の時間インキュベートする。
- ④等張リン酸緩衝液（PBS）で洗浄し、被験物質を取り除く。
- ⑤MTTを含む培地に交換し、3時間インキュベート（37℃、5% CO₂）する。
- ⑥被験物質を適用した部位を打ち抜き、塩酸を含むイソプロパノールでformazanを抽出する。
- ⑦抽出液の570nmにおける吸光度（OD570）を測定する。
- ⑧溶媒対照の吸光度を100%として、生細胞率（%）を算出する。

被験物質の適用時間については議論が残されるが、ECVAMは15分間被験物質を適用し、その後42時間培養後の生細胞率(%)が50%以下である場合に陽性とする方法を提唱している^{8)~10)}。培養皮膚(表皮)モデルとしてEPISKINTMおよびEpidermTMを用いたECVAMのバリデーション¹⁴⁾では、sensitivity(非刺激物質の予測性)が、EPISKINTMおよびEpidermTMでそれぞれ74.7%および57.3%、specificity(刺激物質の予測性)が、それぞれ80.8%および83.8%であった。さらに、IL-1 α の放出を組み合わせることでEPISKINTMにおけるsensitivityは、90.7%に改善されている。また日本においては、小島らによってET50(50%細胞毒性を示す時間、50% Effective Time)による評価が提唱されている^{15) 16)}。

5. 培養細胞を用いた皮膚刺激性試験

化学物質による皮膚刺激は、化学物質が皮膚表面のバリアである角層を通過し、その下にある表皮細胞(角化細胞)あるいは真皮細胞(線維芽細胞)に接触することで引き起こされる。この発生機序から考えると、培養細胞を用いて皮膚刺激性を評価することは有用であると考えられる。また、*in vitro*試験法を発展させることは*in vivo*における予測性を向上させ、実験動物規制や薬物の適正使用に寄与できると考えられる。

そこで我々は、ヒト、モルモットおよびヘアレスマウスの皮膚線維芽細胞を用いて細胞毒性(MTT試験)の種差について検討した¹⁷⁾。刺激物質には、陽イオン界面活性剤である塩化セチルピリジニウム(CPC)を用いた。CPCは、歯磨きなど¹⁸⁾に広く用いられている界面活性剤で、皮膚刺激性を有することが知られている¹⁹⁾。

5-1. 実験方法

- ①各線維芽細胞は、96well マイクロプレートに1 well当たり 2×10^4 cell播種し、2時間プレインキュベート(37℃, 5% CO₂)した。
- ②0~0.03%のCPCを含む培地100 μ Lを各wellに適用し、2時間インキュベート(37℃, 5% CO₂)した。
- ③CPC含有培地を除去し、PBSで洗浄した。
- ④0.333mg/mLのMTTを含む培地を100 μ L適

用し、4時間インキュベート(37℃, 5% CO₂)した。

- ⑤MTT含有培地を除去し、0.04N塩酸/イソプロパノール溶液を100 μ L加えてMTT-formazanを抽出した。

- ⑥マイクロプレートリーダーでOD570を測定した。

5-2. 解析方法

- ①0% CPCをコントロールとして、次式より死細胞率(Dead Cell Number, %)を算出した。

$$\text{Dead Cell Number}(\%) = 100 - \left[\frac{\text{OD570}_{\text{sample}}}{\text{OD570}_{\text{control}}} \right] \times 100$$

- ②死細胞率からSigmoid Emax modelに従う次式を用いて各パラメータを算出した。

$$I = \frac{I_{\max} \times C^{\gamma}}{IC_{50}^{\gamma} + C^{\gamma}}$$

なお、細胞毒性(死細胞率, %)を I とし、 I_{\max} , C , IC_{50} および γ は、それぞれ最大細胞毒性(死細胞率, %), CPC濃度, 50%細胞毒性発現濃度および形状因子を表している。

5-3. 結果

ヒト、モルモットおよびヘアレスマウスの皮膚線維芽細胞のCPCによる細胞毒性の結果を図1に示す。なお、これらのデータは投稿準備中につ

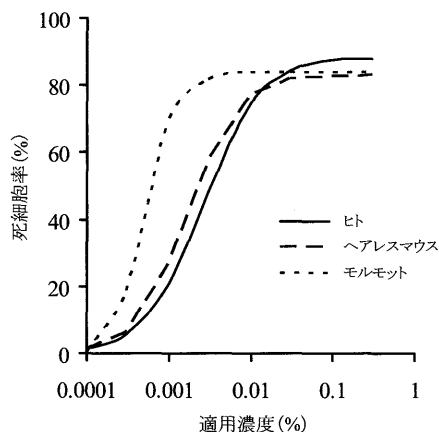


図1 陽イオン界面活性剤(CPC)による線維芽細胞に対する細胞傷害性の種差
(投稿準備中につき、詳細なデータは省略した。)

き詳細を割愛させていただき、その概略を示した。最大細胞毒性である I_{max} は、種によって差はなかったが、感受性を示す IC_{50} は、ヒトとヘアレスマウスがほぼ同じであったのに対し、モルモットでは、ヒトおよびヘアレスマウスのおよそ1/3であった。また、濃度依存性を表す指標である γ は、ヘアレスマウスとモルモットが近い値を示したのに対し、ヒトはヘアレスマウスおよびモルモットのそれぞれ約1/2および約1/3であった。このことから、ヒトに比べて動物の方が刺激物質の濃度変化に対して鋭敏に反応し、さらに、モルモットではより低濃度で細胞毒性を発現することがわかった。つまり、動物実験による過大評価の可能性を示唆している。

6. 皮膚刺激に対する表皮および真皮の関与

一次性皮膚刺激は、非アレルギー性の皮膚障害によって引き起こされる炎症反応である。非アレルギー性の皮膚障害は、アレルギー性接触性皮膚炎に見られるIV型アレルギー反応や、蕁麻疹にみられるI型アレルギー反応といった機序を介さず、皮膚角化細胞や角層に何らかの直接的なダメージを与えられた結果生じる皮膚障害を指す。外来の化学物質、熱あるいは紫外線といった物理的因子によってダメージを受けた表皮角化細胞が種々のサイトカインを産生し、これらにより活性化されたT細胞が集積し、皮膚炎を引き起こすと考えられている²⁰⁾。表皮の有棘層中にはランゲルハンス細胞が存在し、種々のサイトカインの産生能、抗原提示能を有している²¹⁾。また、真皮にも免疫担当細胞であるマクロファージや肥満細胞が少数存在している。真皮は、皮膚に物理学的強度および柔軟性を与えるためコラーゲン、エラスチン、ムコ多糖を含む繊維層を形成しており、細胞密度は表皮に比べて低い。これらの組織学的構成から、表皮が皮膚の免疫反応を担っていると思われる。

6-1. ヘアレスマウスを用いた細胞毒性試験（皮膚薄切片上でのコハク酸脱水素酵素活性の検出）²²⁾

ヘアレスマウス（Hos：Hr-1、♂）の背部皮膚

にCPCを適用後、適用部位皮膚の凍結切片を作製し、皮膚切片上で組織内のコハク酸脱水素酵素活性を検出することで、表皮および真皮に対する細胞傷害性を視覚化した（図2）。コハク酸脱水素酵素は、ミトコンドリアのマーカー酵素であり、その酵素活性を示す青紫色（formazan）は、皮膚全体に認められたが、特に表皮層で高い酵素活性が認められた（図2 a）。一方、CPC投与群では、コントロール群に比べて酵素活性を示す青紫色は全体的に薄かったが、皮膚の上部、特に表皮の活性が著しく低下し（図2 b）、明確な表皮への細胞傷害性が示された。

6-2. keratinocyteとfibroblastを用いた細胞毒性試験

ヒトの表皮角化細胞（keratinocyte）と真皮線維芽細胞（fibroblast）に対するCPCの細胞毒性（MTT試験）の結果を図3に示す。 I_{max} と γ 値はkeratinocyteとfibroblastでそれほど大きな差はなかったが、感受性を表す指標である IC_{50} 値では、keratinocyteがfibroblastの1/10の値を示した。この結果より、刺激物質への耐性は、keratinocyteよりもfibroblastの方が高いと言える。言い換えるとkeratinocyteの方が刺激物質に対して敏感に反応すると考えられる。皮膚の免疫に関して表皮は重要な役割を担っていることは既に述べた。つまり、表皮が刺激に対して先に反応することでそれ以下の組織の破壊を未然に防ぐ働きをしていると考えれば理にかなっている。培養皮膚には、表皮層と真皮層の2層からなる皮膚モデルと表皮層のみからなる表皮モデルがあることを述べたが、いずれのモデルによってもMTT試験を用いて皮

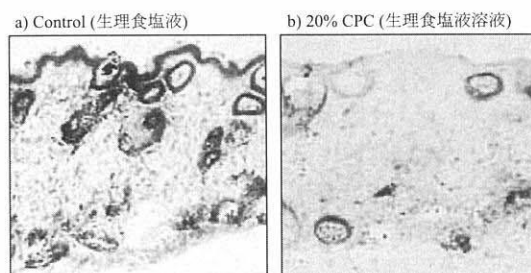


図2 皮膚におけるコハク酸脱水素酵素活性の検出²¹⁾
a) ; 生理食塩水適用皮膚 b) ; 20% CPC適用皮膚
倍率；×10

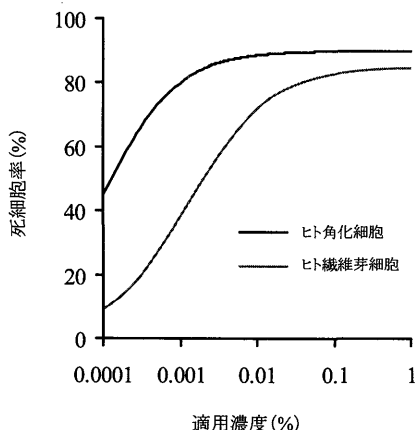


図3 陽イオン界面活性剤 (CPC) のヒト角化細胞および繊維芽細胞に対する細胞傷害性 (投稿準備につき、詳細なデータは省略した。)

膚刺激性を予測する場合には、その結果に大差はないものと考えられる。

7. まとめ

皮膚に適用された化学物質による皮膚刺激性は、基本的にはその物質が持つポテンシャルとその作用部位への到達性 (皮膚透過性) によって決定される。つまり、皮膚刺激能 (ポテンシャル) を持つ物質であっても、皮膚から吸収されなければ皮膚刺激性は示さない。皮膚透過において角層が主なバリアであることはよく知られている²³⁾。そして、このことが化学物質の持つ皮膚刺激能と実際の皮膚刺激性が異なる原因であり、単純な培養細胞による皮膚刺激性の評価を困難にしていると考えられる。三次元培養皮膚 (表皮) モデルは、その構造中に角層を有しており、*in vitro* 皮膚刺激性試験に用いる利点の一つと考えられる。また、皮膚 (表皮) モデルでは最終的な製剤を適用することができる点において単純な培養細胞系を用いる検討に対して絶対的なアドバンテージがある。本来、皮膚刺激性評価はある濃度における刺激の有無に焦点が当てられる。そのため、適用した被験物質の濃度と被験物質を適用してから十分に時間が経過した後の最終的な反応の関係が評価される。しかしながら、ヒトにおける最終的な反応を予測するためには、その物質が持つポテンシャルと皮膚透過性の両面を考慮することが重要であ

る。我々は、PK/PDに着目した皮膚刺激性の速度論的な解析についても行っているが^{22) 24)}、詳細については誌面の都合で割愛する。

8. おわりに

今回紹介した方法は、単回の刺激 (曝露) によって引き起こされる皮膚刺激、つまり一次刺激性を評価する方法である。刺激性のメカニズムは単一ではなく、様々な要因が関与している。一例を挙げると、クロトン油は皮膚刺激性物質として知られるが、細胞毒性 (MTT試験) を指標としたこの方法では、検出することができない。また、いくつかの偽陽性を含む方法であり、完全な方法ではないことに注意されたい。さらに、幾つかの評価法を組み合わせたバッテリー試験は、ヒトにおける皮膚刺激性の予測の向上に繋がるものと考えられる。

参考文献

- 1) Draize J.H., Woodard G., Galvery H.O., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **82**, 377 (1944)
- 2) DIRECTIVE 2003/15/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 27 February 2003, amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products, Official J. European Union, L66/26.
- 3) OECD Guidelines for the testing of chemicals :432, In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test
- 4) 大野泰雄, 平成14年度厚生労働科学研究, 動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究 (H13 - 医薬- 024) : Balb/c 3T3 細胞を用いたNeutral Red 取り込みを指標とした光毒性試験代替法の評価結果報告 (2003)
- 5) Botham P.A. et al., *Altern. Lab. Anim.*, **26**(2), 195 (1998)
- 6) Fentem J.H. et al., *Toxicol. In Vitro*, **15**(1), 57, (2001)
- 7) Faller C. et al., *Toxicol. In Vitro*, **16**(5), 557 (2002)
- 8) Zuang V. et al., *Altern. Lab. Anim.*, **30**(1), 109 (2002)
- 9) Kandárová H., *ALTEX*, **21**(3), 107 (2004)
- 10) Kandárová H. et al., *Altern. Lab. Anim.*, **33**(4), 351 (2005)
- 11) Cotovio J. et al., *Altern. Lab. Anim.*, **33**(4), 329 (2005)
- 12) Kojima H. et al., Validation study for Vitrolife-

- Skin™, a three-dimensional cultured human skin model, II, as a alternative to skin irritation testing using Post-Incubation (PI) protocol, 5th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2005)
- 13) 久保健太郎 他, *Fragrance Journal*, **34**(1), 56 (2006)
 - 14) ESAC statement, Statement of the validity of in-vitro tests for skin irritation (2007) (<http://ecvam.jrc.it/>)
 - 15) Kojima H. et al., Validation study for Vitrolife-Skin™, a three-dimensional cultured human skin model, I, as an alternative to skin irritation testing using ET50 protocol, 5th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2005)
 - 16) Kojima H. et al., Validation study for TEST-SKIN™, a three-dimensional cultured human skin model, as alternatives to skin irritation testing applied to forty cosmetic substances, 5th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2005)
 - 17) 石井宏 他, 培養細胞を用いた皮膚刺激性評価, 日本動物実験代替法学会代20回大会 (2006)
 - 18) Parran J.J. Jr., Mouthwash compositions, US patent No. 4323551, The Procter & Gamble Co. (1981)
 - 19) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS), No. UU5075000
 - 20) Welss T., Basketter DA, Schroder KR, *Toxicol. In Vitro.*, **18**, 231 (2004)
 - 21) 鈴木 正 編集, “皮膚科学”, コーセー研究所(株) (1992)
 - 22) Kano S., Sugibayashi K., *Pharm. Res.*, **23**(2), 329 (2006)
 - 23) Marzulli F.N., *J. Invest. Dermatol.*, **39**, 387 (1962)
 - 24) Sugibayashi K. et al., *Toxicol. In Vitro.*, **16**, 759 (2002)